



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Off nlegungsschrift**
⑩ **DE 199 18 689 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
G 02 B 21/00

②① Aktenzeichen: 199 18 689.8
②② Anmeldetag: 23. 4. 1999
④③ Offenlegungstag: 16. 11. 2000

⑦① Anmelder:
Großkopf, Rudolf, Dr.-Ing., 89551 Königsbronn, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Vorrichtung zur dreidimensionalen confocalen optischen Untersuchung eines Objektes mit Beleuchtung durch eine Lochplatte

DE 199 18 689 A 1

DE 199 18 689 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur dreidimensionalen Untersuchung eines Objektes nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

In der confocalen Mikroskopie wird das Objekt in an sich bekannter Weise durch eine Lochblende beleuchtet und der beleuchtete Punkt des Objektes wird mit einem Strahlungsempfänger beobachtet, dessen lichtempfindliche Fläche ebenso klein ist wie der von der Beleuchtungsblende erzeugte Beleuchtungspunkt (Minsky, M., US Patent 3 013 467 und Minsky, M., Memoir on inventing the confocal scanning microscope, Scanning 10, p. 128-138). Confocale Mikroskopie hat gegenüber konventioneller den Vorteil, daß sie Tiefenauflösung (Messung in z-Koordinate) liefert und daß wenig Streulicht bei der Bildaufnahme entsteht. Nur die im Focus befindliche Ebene des Objektes wird hell beleuchtet. Objektebenen oberhalb und unterhalb der Focusebene erhalten deutlich weniger Licht. Das Bild wird durch einen Scannvorgang aufgebaut. Es können einer oder mehrere Punkte gleichzeitig beleuchtet und beobachtet werden.

Drei Methoden für den Scannvorgang sind bekannt: Spiegelscannen, Nipkowscheibe und electropisches Scannen mit Matrixempfänger. Weitere Einzelheiten zum Stand der Technik beim Scannen mit Spiegel oder mit Nipkowscheibe finden sich zum Beispiel im Handbook of Biological Confocal Microscopy, Plenum Press, New York, London (Hrsg. James B. Pawley).

Ein confocales Bildaufnahmesystem mit confocaler Beleuchtung durch eine Lochplatte und Bildscan durch Matrixempfänger wurde erstmals in DE 40 35 799 vorgeschlagen. Dabei kommt ein Matrixempfänger zum Einsatz, dessen Pixel nur auf einem Teil (z. B. 30%) der dem Pixel zugeordneten Fläche lichtempfindlich sind und auf der Beleuchtungsseite wird typischerweise eine Lochplatte eingesetzt, die ebenso viele Löcher hat wie der Bildsensor lichtempfindliche Pixel. Die Tiefeninformation ergibt sich durch Aufnahme mehrerer Bilder aus verschiedenen Focusebenen und Auswertung des Helligkeitsmaximums individuell für die verschiedenen Pixel im Computer.

In der Druckschrift DE 198 48 316 wird eine Anordnung geschildert, bei der typischerweise zugeordnet zu je vier Empfängerpixeln ein Beleuchtungsloch auf der Lochplatte vorgesehen ist und bei der unmittelbar vor dem Matrixempfänger ein Prismenarray vorgesehen ist. Das Prismenarray wirkt als strahlformendes Element, mit dem das Licht eines jeden Beleuchtungspunktes so aufgespalten wird, daß sich außerhalb des Focus zwei halbmondförmige Bilder ergeben. In der Druckschrift DE 196 51 667 A1 ist eine Anordnung beschrieben, bei der ebenfalls typischerweise je vier Empfängerpixeln ein Beleuchtungsloch auf der Lochplatte zugeordnet ist und die unmittelbar vor dem Empfängerarray ein Array anamorphotischer Linsen enthält. Jedem Beleuchtungsloch ist eine Linse zugeordnet. Die anamorphotischen Linsen wirken hier ebenfalls als strahlformende Elemente, so daß sich im Focus eine kreisförmige und außerhalb ein ovales Bild des Beleuchtungspunktes ergibt. Bei den beiden letztgenannten Anordnungen wird die Tiefeninformation durch Auswertung der Differenz der Lichtsignale benachbarter Pixel gewonnen.

Die Anordnungen nach DE 40 35 799, DE 196 48 316 und DE 196 51 667 A1 haben unter anderem den Vorteil, daß sehr viele Tiefenmeßpunkte gleichzeitig aufgenommen werden können und sie haben den Nachteil, daß keine Farbbilder aufgenommen werden können. Die vorliegende Erfindung hat deshalb zur Aufgabe, einen Weg aufzuzeigen, wie unter Einsatz verfügbarer, farbtauglicher Matrixempfänger confocal Bilder aufgenommen werden können. Diese Auf-

gabe stellt sich unter anderem in der Gentechnologie, der Krebsforschung und der Krebsvorsorgeuntersuchung (Screening). Dort gilt es, in kurzer Zeit viele Gewebszellen nach kleinen (z. B. 200 nm) fluoreszierenden oder angefärbten Stellen dreidimensional abzuscanen.

Die Erfindung sieht dazu vor, in Ebenen, die der Focusebene des Objektes optisch konjugiert sind, sowohl auf der Beleuchtungsseite als auch auf der Beobachtungsseite je eine Lochplatte anzuordnen und hinter der auf der Beobachtungsseite befindlichen Lochplatte, also außerhalb des Focus, in geeignetem Abstand einen farbtauglichen Matrixempfänger anzuordnen.

Die Figuren zeigen beispielhaft mögliche praktische Ausführungen der Erfindung.

Fig. 1 zeigt eine Gesamtanordnung einer Bildaufnahme-einrichtung nach der Erfindung.

Fig. 2a, 2b und 2c zeigen eine kompakte Baugruppe mit zwei Lochplatten, Strahlteilerwürfel und farbtauglichem Matrix-Strahlungsempfänger, die erfindungsgemäß verwendet werden.

Fig. 3a, 3b und 3c zeigen den Strahlengang im Strahlteilerwürfel in verschiedenen Focuslagen.

Fig. 4a und 5a zeigen zwei Ausführungen von Farbzellen des Matrixempfängers.

Fig. 4b und 5b zeigen die den Farbzellen zugeordneten spektralen Lichtdurchlaßkurven der den Pixeln vorgelagerten Lichtfilterelemente.

Fig. 6 zeigt ein Beispiel für eine Anordnung des Matrixempfängers (17) in geeignetem Abstand von der Ebene der confocalen Beobachtungsblenden.

Fig. 7 zeigt die zu Fig. 6 gehörigen drei Sensorzellen des Matrixempfängers in Draufsicht.

In Fig. 1 ist mit (11) eine Lichtquelle, z. B. eine Halogenlampe, bezeichnet, die mit Hilfe des Kondensors (11k), Löcher in einer Schicht beleuchtet. Eine derartige Schicht kann in bekannter Weise z. B. aus Chrom auf einer Glasplatte (12g) hergestellt werden. Die Löcher sind in der Schicht rasterförmig angeordnet. Zum Beispiel enthält die Schicht 256 · 256 Löcher mit einem Abstand von 22 µm und mit einer Lochgröße von z. B. 4 µm × 4 µm. Die Löcher sind also erheblich kleiner als ihr Abstand. Der Abstand der Löcher bzw. Bereiche von Mitte zu Mitte wird als Rastermaß bezeichnet.

Das durch die beleuchteten Löcher in der Schicht erzeugte Beleuchtungsraster liegt in der Beleuchtungsebene (120b). Diese wird durch die Linsen (13o, 13u) in die Focusebene (13f) abgebildet, so daß in letzterer das Objekt (14) mit rasterförmig angeordneten Lichtpunkten beleuchtet wird. Bei nicht transparenten Objekten kann nur die Oberfläche (14o) beleuchtet werden, während bei transparenten Objekten auch Schichten (14s) im Inneren mit den Lichtpunkten befeuchtet werden können. Die vom Objekt in der Focusebene (13f) reflektierten Lichtstrahlen werden von den Linsen (13u, 13o) über einen Strahlteiler (16) in der Blende (121b) focussiert.

Der vorerwähnte Strahlteiler (16) ist für Auflichtanwendungen als halbdurchlässiger Spiegel ausgeführt. Für Fluoreszenzanwendungen wird in an sich bekannter Weise ein dichroitischer Spiegel eingesetzt.

Das Objekt (14) kann durch eine Verstellvorrichtung (15) in allen 3 Raumrichtungen bewegt werden, so daß verschiedene Schichten (14s) des Objektes (14) abgescannt werden können. Dabei kann die Bewegung in x- und y-Richtung kleiner gewählt werden als das Rastermaß der Lichtpunkte. Selbstverständlich kann die Bewegung des Objektes (14) in z-Richtung auch durch Verschieben der Linsen (13o, 13u) in Richtung der optischen Achse (10) erreicht werden und ebenso können anstelle der Bewegung des Objektes in x-

und y-Richtung auch die Schicht mit den Löchern und das Empfängerarray (17) entsprechend bewegt werden.

Die Signale des Empfängerarrays (17) werden über die Verbindungsleitung (17v) in einen Computer (18) übertragen, der in bekannter Weise die Auswertung übernimmt und auf einem Bildschirm (18b) die Ergebnisse der Auswertung z. B. in Form von graphischen Darstellungen wiedergibt. Der Computer (18) kann auch über die Verbindungsleitung (18v) die Verschiebung der Focusebene (13f) im Objekt und das Scannen in x- und y- Richtung steuern. Diese Steuerung kann im Computer als festes Programm vorliegen oder abhängig von den Ergebnissen der Auswertung erfolgen.

Fig. 2a zeigt, wie die erfindungsgemäß vorgesehenen zwei Lochplatten (120), (121) und der Matrixempfänger (17) zusammen mit dem Strahlteilerwürfel (20) in einer kompakten Baugruppe angeordnet werden können. Im dargestellten Beispiel sind die Lochplattenmuster direkt auf Oberflächen des Strahlteilerwürfels aufgebracht. Die Teilerschicht (16) im Strahlteiler kann einen für alle Lichtwellenlängen gleichartigen Tellerfaktor von z. B. 50% haben, oder sie kann z. B. für Fluoreszenzanwendungen als dichroitische Schicht ausgebildet sein.

Fig. 2b zeigt den Strahlteilerwürfel aus der Ansicht B, gibt also das Lochplattenmuster der Beleuchtungsebene wieder. Es versteht sich, daß in Wirklichkeit sehr viel mehr Löcher vorhanden sind als das im Beispiel wiedergegebene Raster von 6 · 6 Löchern. Typischerweise werden z. B. 512 · 512 Löcher zum Einsatz kommen. In der Praxis wird das Lochmuster der Matrix der Strahlungsempfänger auf dem zum Einsatz kommenden Empfänger angepaßt.

Fig. 2c zeigt den Strahlteilerwürfel aus der Ansicht C, wobei der Matrixempfänger selbst hier weggelassen worden ist, so daß das Lochplattenmuster der Beobachtungsebene sichtbar ist. Es ist mit dem gleichen Rastermaß und der gleichen Lochanzahl ausgeführt wie das Lochplattenmuster der Beleuchtungsseite. So ergibt sich für jeden der parallel verlaufenden Strahlengänge ein confocaler Strahlengang. Es werden also z. B. $512 \cdot 512 = 262144$ Bildpunkte gleichzeitig farbig und confocal erfaßt. Diese parallele Anordnung von sehr vielen Strahlengängen erlaubt die rasche Erfassung großer Probenvolumina. So gelingt es zum Beispiel, in kurzer Zeit viele krebserkrankte Zellen, deren Gene spezifisch mit Markern versehen sind, auf das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein der Marker in den individuellen Zellen zu untersuchen.

Verfahren zur spezifischen Markierung von Krebsgenen sind in jüngster Zeit entwickelt worden. Siehe dazu z. B. die Habilitationsschrift "Spektrale Karyotypisierung und vergleichende genomische Hybridisierung - neue Methoden zur umfassenden Analyse chromosomaler Aberrationen in der klinischgenetischen Diagnostik und der Tumorgenetik" von E. Schröck, Humboldt-Universität, Berlin.

Fig. 3a, b und c veranschaulichen den confocalen Effekt. In Fig. 3a ist der Strahlengang im Strahlteilerwürfel für einen der parallelen Strahlengänge wiedergegeben, wobei angenommen ist, daß der zugehörige Objektpunkt sich im Focus befindet. Sämtliches von der Beleuchtungsebene (120b) ausgehende und von dem Objektpunkt zurückgesandte Licht tritt durch das zugehörige Loch in der Beobachtungsebene (121b) hindurch. Der hier nicht eingezeichnete, links von der Ebene (121) befindliche Sensor erhält also für dieses Bildelement viel Licht.

In Fig. 3b ist ebenfalls der Strahlengang im Strahlteilerwürfel für einen der parallelen Strahlengänge wiedergegeben, wobei hier angenommen ist, daß der zugehörige Objektpunkt sich außerhalb des Focus befindet. Nur ein Teil des von der Beleuchtungsebene (120b) ausgehenden und von dem Objektpunkt zurückgesandten Lichtes kann durch

das zugehörige Loch in der Beobachtungsebene (121b) hindurchtreten. Das Bild des Objektpunktes, das in der Ebene (121) entsteht, ist links davon schematisch wiedergegeben. Der schraffierte Bereich veranschaulicht, welcher Lichtanteil abgedunkelt wird. Der hier nicht eingezeichnete, links von der Ebene (121) befindliche Sensor erhält also für dieses Bildelement weniger Licht als es im Focus der Fall wäre.

Während in Fig. 3b angenommen ist, daß der Objektpunkt näher am Objektiv liegt als der Focuslage entspricht, ist für Fig. 3c angenommen, daß der Objektpunkt weiter weg vom Objektiv liegt als die Focusebene. Die abblendende Wirkung ist, wie links im Bild dargestellt, die gleiche wie bei der Ablage entsprechend Fig. 3b.

Fig. 4a zeigt eine Sensorzelle (17a), der vier verschiedene und unabhängig voneinander auslesbare lichtempfindliche Bereiche des Matrixempfängers zugeordnet sind und denen je ein Lichtfilter A, B, C, D vorgelagert ist. Die Lichtfilter A, B, C, D haben unterschiedliche spektrale Lichtdurchlaßkurven, die in Fig. 4b wiedergegeben sind.

Fig. 5a zeigt eine andere Ausführung der Sensorzelle (17a), der wiederum vier verschiedene und unabhängig voneinander auslesbare lichtempfindliche Bereiche des Matrixempfängers zugeordnet sind. Die hier wiedergegebene Lichtfilteranordnung ist dem Datenblatt des Matrixempfängers ICX084AK des Herstellers Sony entnommen. Dabei haben die mit Gb und Gr bezeichneten Teilflächen eine spektrale Empfängercharakteristik, die in Fig. 5b mit G bezeichnet ist. Gb und Gr gehören jedoch zu verschiedenen Zeilen des Matrixempfängers. Die mit B (blau) und R (rot) bezeichneten lichtempfindlichen Bereiche des Matrixempfängers haben die zugehörigen in Fig. 5b dargestellten Durchlaßkurven B und R.

Fig. 6 veranschaulicht, in welchem Abstand der Matrixempfänger zweckmäßigerweise hinter dem empfängerseitigen Lochmuster angeordnet werden kann. Dieser Abstand hängt vom Aperturwinkel α der Abbildungsoptik und dem Lochabstand auf den Lochplatten ab. In einer zweckmäßigen Ausführung der Erfindung wird - wie erwähnt - als Lochabstand auf den Lochplatten das gleiche Maß gewählt, wie der Abstand der Empfängerzellen auf dem zum Einsatz kommenden Matrixarray. Damit nun zur Farbaufnahme für jeden beleuchteten Probenort eine vollständige Farbauswertung möglich wird, muß das Licht, das durch das zugehörige Beobachtungsloch hindurchtritt, auf alle Teilflächen der Sensorzelle verteilt werden. Die divergierenden Linien (22a, 22b) veranschaulichen, daß sich das Licht links von der Lochplattenebene (121b) auf eine mit dem Abstand größer werdende Fläche verteilt. Erfindungsgemäß ist es zweckmäßig, den Matrixempfänger in einem solchen Abstand s von der Lochplattenebene (121b) anzuordnen, daß seine Empfängererebene (17b) mit den Schnittpunkten der divergierenden Randstrahlen (22a, 22b) benachbarter Löcher zusammenfällt. So werden die Empfängerzellen voll ausgeleuchtet und die Farbcharakteristik der Probenpunkte kann vollständig erfaßt werden.

Zur weiteren Veranschaulichung ist in Fig. 7 der zur Anordnung nach Fig. 6 gehörige Teil des Farbmultiplexerarrays (17) wiedergegeben (Ansicht um 90 Grad gedreht).

Die Anordnung ist nicht auf den Einsatz von farbtüchtigen Matrixsensoren beschränkt. Anstelle der vier verschiedenen Spektralbereiche erfassenden Zellen können auch einzelne, entsprechend größere Pixel eines schwarz-weiß empfindlichen Matrixsensors eingesetzt werden, die auf ihrer ganzen Oberfläche lichtempfindlich sind. In solcher Ausführung dient die Erfindung einer confocalen Bildaufnahme mit Matrixsensoren, deren Pixel auf der gesamten ihnen zugeordneten Fläche lichtempfindlich sind.

Es ist auch nicht erforderlich, obgleich zweckmäßig, daß

das Rastermaß der zum Einsatz kommenden Matrixsensoren gleich oder ein ganzzahliges Vielfaches des Rastermaßes der Lochplatten ist. Die confocale Wirkung entsteht durch die beiden Lochplatten. Deshalb darf das Rastermaß der Matrixsensoren im Prinzip beliebig vom Rastermaß der Lochplatten abweichen. Allerdings können sich dann Effekte des Aliasing und andere Bildartefakte ergeben, die unter Umständen störend sein können.

Bezugszeichenliste

10 optische Achse	
11 Lichtquelle	
11f Filter	
11k Kondensor	15
121 Löcher	
12s Schicht	
13f Focusebene	
13m Mittenstrahl	
13t Telezentriertblende	20
13o, 13u Linsen	
14 Objekt	
14o Oberfläche	
14s Schicht	
15 Verstellvorrichtung	25
16 Strahlteiler	
17 Farbbildsensor	
17a Sensorzelle	
17b Farbempfängerebene	
17v Verbindungsleitung	30
18 Computer	
18b Bildschirm	
18v Verbindungsleitung	
20 Strahlteilerwürfel	
22a, 22b divergierende Linien	35
82 Bild des Objektpunktes,	
120 Lochplatte auf der Beleuchtungsseite	
120b Ebene der confocalen Beleuchtungsblenden	
121 Lochplatte auf der Beobachtungsseite	
121b Ebene der confocalen Beobachtungsblenden	40
s Abstand zwischen Lochplatte und Farbempfängerarray	
α Aperturwinkel der Abbildungsoptik	
A, B, C, D Lichtfilter	
Gr, Gb Lichtfilter für grün	
B Lichtfilter für blau	45
R Lichtfilter für rot	
T Transmissionsverlauf des Lichtfilters	
λ Lichtwellenlänge	

Patentansprüche

50

1. Vorrichtung zur dreidimensionalen Untersuchung eines Objektes,

- mit einem in einer Beleuchtungsebene angebrachten Beleuchtungsraster (120), das eine Vielzahl Leuchtpunkte erzeugt,
- mit einem oder mehreren optischen Elementen (13o, 13u), die das Beleuchtungsraster in eine Focusebene am Ort des zu messenden Objektes (14) und das von dort abgestrahlte Licht in eine Beobachtungsebene abbilden,
- und mit einem Empfängerarray (17) mit lichtempfindlichen Bereichen, das das von den optischen Elementen (13o, 13u) übertragene und im oder am Objekt reflektierte oder durch Fluoreszenz emittierte Licht registriert,

dadurch gekennzeichnet daß auf der Beleuchtungsseite und auf der Beobachtungsseite je eine Lochplatte

(120, 121) in einer Focusebene angebracht und daß hinter der Lochplatte (121) auf der Beobachtungsseite ein Matrixsensor (17) zur Bildaufnahme hinter der Focusebene angeordnet ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Lochplatten (120, 121) ebenso viele Löcher enthalten, wie der Bildsensor (17) Sensorzellen (17a) oder daß die Anzahl der Sensorzellen ein ganzzahliges Vielfaches der Anzahl der Löcher ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sensorzellen (17a) Farbinformation aufnehmen können.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Matrixempfänger (17) in einem solchen Abstand von der beleuchtungsseitigen Lochplatte angeordnet sind, daß das unscharfe Bild der Beleuchtungspunkte jeweils eine Sensorzelle (17a) ausleuchtet.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

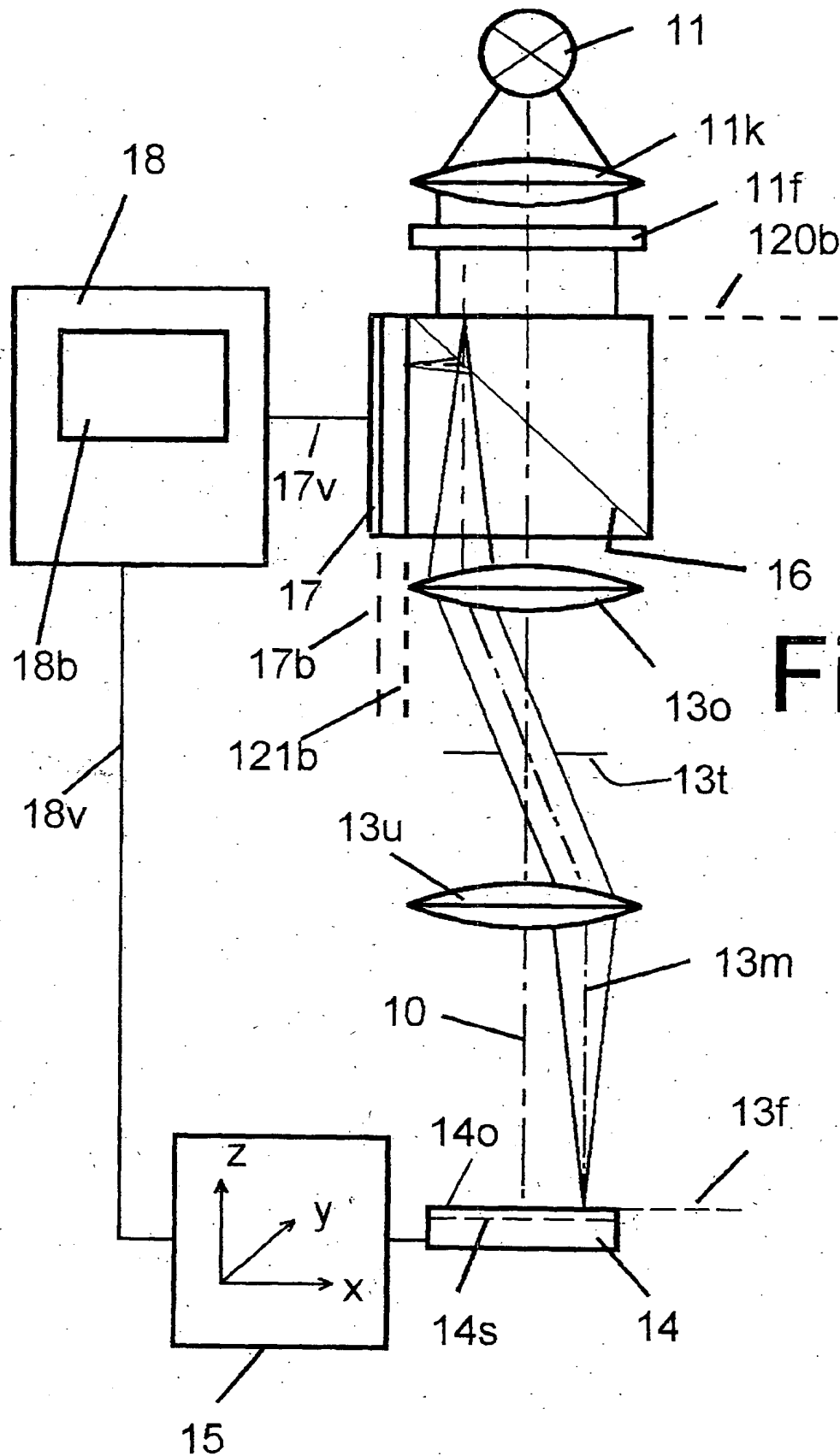


Fig. 1

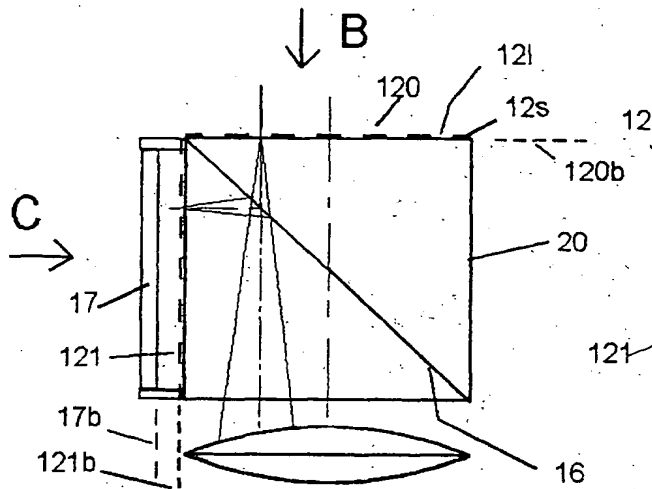


Fig. 2a

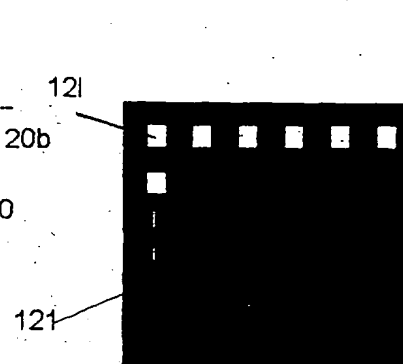


Fig. 2c

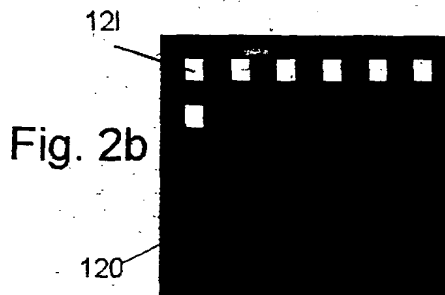


Fig. 2b

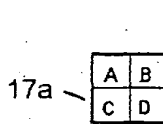


Fig. 4a

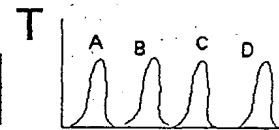


Fig. 4b

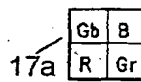


Fig. 5a

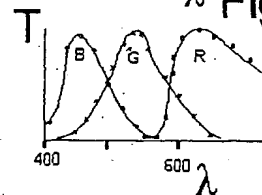


Fig. 5b

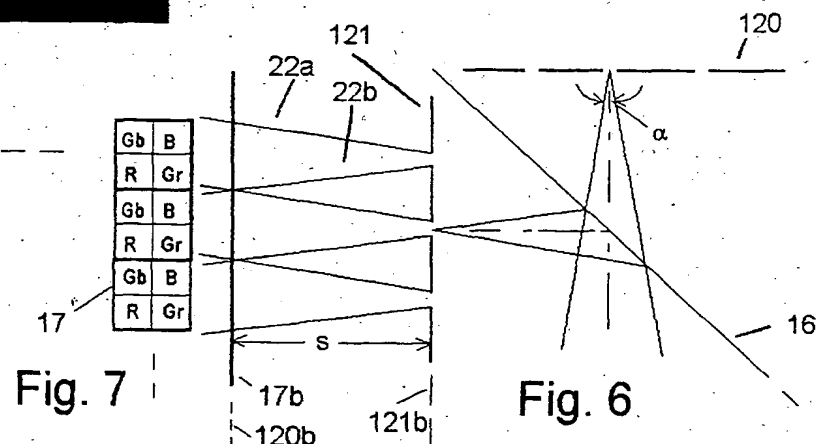
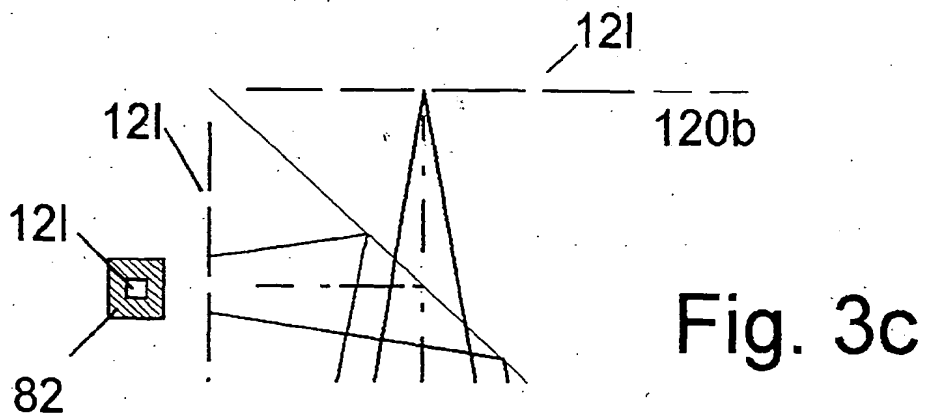
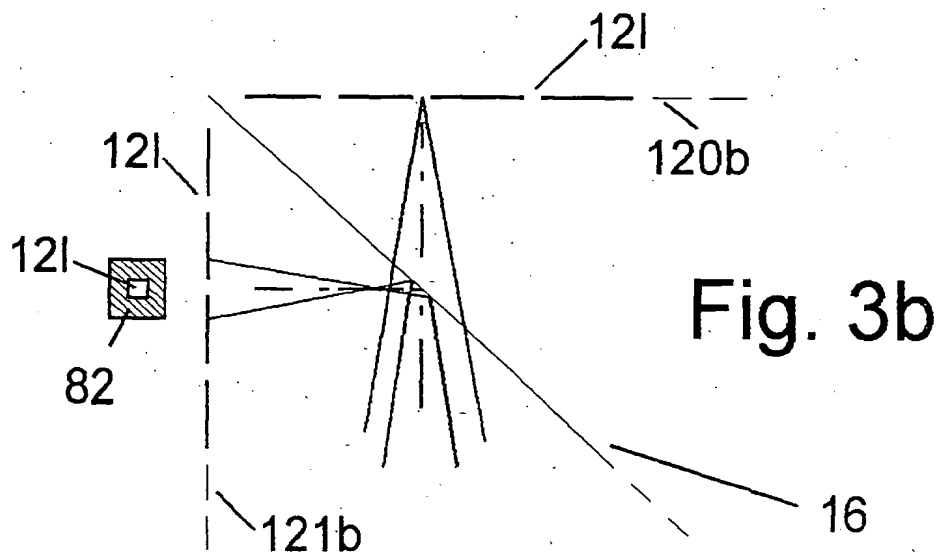
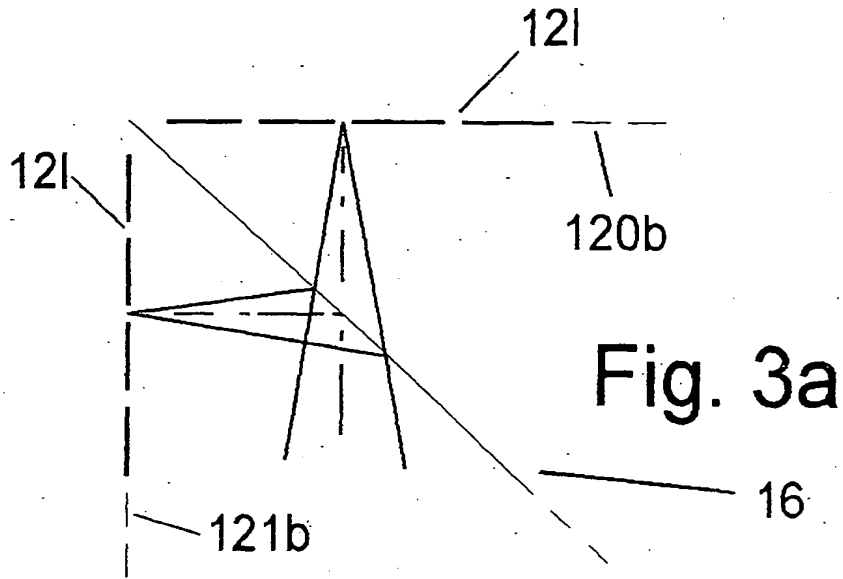


Fig. 6

Fig. 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)